



KONGERIKET NORGE  
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr  
*Certification of patent application no*

1999 6333

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

*Freddy Strømmen*

Freddy Strømmen  
Seksjonsleder

*Line Reum*

Line Reum



PATENTSTYRET®

Styret for det industrielle rettsvern

16  
PATENTSTYRET

20.DES99 996333

20 DES. 1999

EK/KBN

17.12.99

E10510

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow  
Fløensbakken 41A  
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

**Metoder til bruk ved sekvensanalyse**

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører metoder for kvantitering, størrelsesbestemmelse og identifisering av DNA-molekyler og som vil være metoder til bruk ved sekvensanalyse.

### Metoder for kvantitering, størrelsesbestemmelse og identifisering av DNA molekyler:

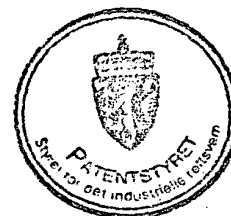
Gel elektroforese er et viktig genteknologisk verktøy til å kvantitere og størrelsesbestemme DNA molekyler. Metodikken som er omtalt i patentsøknad nr. 19986133 kan i tillegg til DNA sekvensering også erstatte andre oppgaver som tradisjonelt har vært løst med gel elektroforese. Nedenfor følger strategier for å størrelsesbestemme, kvantitere og evt sekvensere DNA molekyler basert på følgende prinsipp: Sjansen for at et DNA molekyl blir kuttet (med DNaseI, sonikering, etc.) er proporsjonal med DNA molekylets lengde. F.eks. vil et DNA molekyl på 200bp bli kuttet dobbelt så ofte som et på 100bp i en løsning med underskudd av DNaseI.

Et DNA molekyl kan derfor størrelsesbestemmes med følgende fremgangsmåte. Den ene enden på DNA molekylet (mål DNA) merkes med en markør som kan registreres med et flow cytometer, f.eks. en mikrosfære med rød fluorescens. Den andre enden merkes med en annen markør, f.eks. en mikrosfære med blå fluorescens. På samme måten merkes et DNA molekyl med kjent størrelse (markør) hvor minst en av endene er merket på en annen måte enn mål DNA'en (f.eks. grønn og gul fluorescens). Deretter blandes de to løsningene med DNA molekyler og behandles slik at noen av DNA molekylene blir kuttet uspesifikt, f.eks. med DNaseI. Hvis løsningen deretter analyseres med et flow cytometer vil det bli registrert 6 ulike signaler: blått, rødt, grønt, gult, blårødt og gulgrønt. De blårøde og gulgrønne signalene oppstår når ukuttede DNA molekyler med to ulike mikrosfærer festet passerer avlesningsenheten. Signalene med blått, rødt, grønt og gult derimot, oppstår når kuttete DNA molekyler passerer. Ved telle antallet ulike signaler får man dermed informasjon om både lengde og konsentrasjon. Er det f.eks. ratioen blå+rød/blårød dobbelt så stor som ratioen gul+grønn/gulgrønn betyr det at mål DNA'en er dobbelt så lang som markør DNA'en. Tilsvarende vil ratioen blå+blårød/gul+gulgrønn være det samme som konsentrasjons ratioen mellom mål og markør DNA.

Siden et flowcytometer kan registrere mange tusen signaler per sekund får man raskt et tallmateriale som er stort nok til å gjøre svært presise beregninger. Det må samtidig poengteres at et hvert instrument/ innretning som kan kvantitere og registrere forskjellen på kuttet/ukuttet kan brukes til å utføre analysen. F.eks. kan man tenke seg tilsvarende forsøk

utført med fluorescensscannere og utrettet DNA, scintillasjonstellere, mm. Et annet poeng er at grunnprisnippet er like gyldig enten DNA molekylerne er 10 eller  $10^9$  bp lange. Forutsatt at man bruker egnede markører og tilpasser mengden uspesifikk kutting kan man derfor analysere kromosomer i et forsøk, mens man analyserer oligonukleotider i et annet.

Ønsker man å analysere en heterogen populasjon med DNA molekyler er man nødt til å bruke ulike markører for ulike DNA molekyler. F.eks. kan man endemerke DNA molekylerne med adaptere som gjenkjenner f.eks. de 4-5 første baseparene på hvert molekyl. Deretter kan man f.eks. analysere DNA molekylerne med et flow cytometer ved å la dem passere avlesningsenheten i utstruktet form slik som beskrevet i tidligere innsendte dokumenter. Ved å telle adaptere som passerer hhv enslig og parvis får man dermed den samme informasjonen som ovenfor. Denne metoden kan utvides ytterligere slik at den brukes til ren DNA sekvensering.



## P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d  
beskrivelsen.



1e

PATENTSTYRET

20.DES99 996333

20 DES. 1999

Sammendrag

O. nr. E10510

Metoder for å kvantifisere, størrelsesbestemme og identifisere DNA-molekyler til bruk ved sekvensanalyse.

